

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität
(Direktor : Prof. Dr.H.P.Wolff)

Methodische Untersuchungen zur Bestimmung intrathrombozytärer Enzyme
des Kohlenhydratstoffwechsels mit Hilfe des Plasmasubtraktionsverfahrens

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, den Medizinischen Fachbereichen
[REDACTED]

vorgelegt von
Stefan Kehr
[REDACTED]
aus Mainz

Mainz
1973
[REDACTED]



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554425_0059

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität
(Direktor : Prof. Dr.H.P.Wolff)

Methodische Untersuchungen zur Bestimmung intrathrombozytärer Enzyme
des Kohlenhydratstoffwechsels mit Hilfe des Plasmasubtraktionsverfahrens

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Stefan Kehr
aus Mainz

Mainz
1973



Referent : Prof. Dr. W. Ohler

Korreferent : Prof. Dr. K.H.Bässler

Fachbereichsdekan : Prof. Dr. J. Fischer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	
1. Bedeutung intrathrombozytärer Enzyme	1
2. Methoden zur Bestimmung intrathrombozytärer Enzyme	2
3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	5
II. Methodisches Vorgehen	
1. Enzymmessungen	6
2. Statistische Auswertungsverfahren	10
III. Ergebnisse	11
IV. Diskussion der Ergebnisse	21
V. Zusammenfassung	24
VI. Literaturverzeichnis	25
Abkürzungen	28
Lebenslauf	29

I. Einleitung

1. Bedeutung intrathrombozytärer Enzyme

Ein ungestörter Energiestoffwechsel der Thrombozyten ist eine Voraussetzung ihrer intakten Funktion. WALLER, LÖHR u. Mitarbeiter (25) konnten zeigen, daß dem Kohlenhydratstoffwechsel für die Energiebildung in den Thrombozyten die größte Bedeutung zukommt. Hierbei wiesen sie die Ausstattung der Thrombozyten mit Enzymen der Glykolyse, des Hexosemonophosphatzyklus sowie der Atmungskette nach.

Vergleichende Aktivitätsmessungen intrathrombozytärer Enzyme von GOEBBEL u. Mitarbeitern (7) haben ergeben, daß die Meßwerte der Aktivitäten der glykolytischen Enzyme um ein bis zwei Größemordnungen höher sind als diejenigen des Zitratzyklus, der Transaminierungsreaktionen und der direkten Glukoseoxidation. Die hohe Aktivität insbesondere der LDH ist Ausdruck der großen Kapazität zur anaeroben Glykolyse in den Blutplättchen. Weiterhin konnten GOEBBEL u.a. (7) zeigen, daß in normalen menschlichen Thrombozyten wichtige Enzyme der Fettsäureoxidation (Hydroxyacyl-dehydrogenase, β -Ketothiolase) vorhanden sind. Die Ähnlichkeit mit der Enzymausstattung der menschlichen Skelettmuskelzelle, die ihren Ruhestoffwechsel vorwiegend aus der Fettsäureoxidation bestreitet, könne auf eine derartige Regulierung der Energieversorgung auch in den Blutplättchen hinweisen (7).

BEESE u.a. (1) und KOCHOLATY (9) bestimmten die Aktivitäten proteolytischer Enzyme in menschlichen Blutplättchen. Es wäre denkbar, die bekannte Labilität der Thrombozyten mit einer generalisierten Autolyse zu erklären, die unter bestimmten Bedingungen durch Wirksamwerden der zumeist intralysosomal gelegenen proteolytischen Enzyme in Gang kommt (1).

Eng gekoppelt mit einer ungestörten Enzymaktivität des Kohlenhydratstoffwechsels und einem normalen ATP-Gehalt ist eine der wichtigsten Thrombozytenfunktionen, die Retraktion (12). Ein gestörter Kohlenhydratstoffwechsel mit ATP-Verminderung hebt die regelrechte Retraktion auf.

Analog der höheren Enzymausstattung in jugendlichen Erythrozyten (RAPOPORT (20), WITT, MÜLLER u. KÜNZER (27)) konnten LÖHR u. WALLER (14) einen Enzymverlust nach Alterung von Thrombozyten *in vitro* nachweisen, der schließlich zu ATP-Mangel und Störung der Plättchenretraktion bei normalem Gehalt an Plättchenfaktor 3 führte.

Demnach ist die Bestimmung intrathrombozytärer Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels von Bedeutung zur Diagnose einer Enzymopathie der Blutplättchen (OHLER (15, 17), LÖHR, WALLER u. GROSS (12), WALLER u. GROSS (26)).

2. Methoden zur Bestimmung intrathrombozytärer Enzyme

Zur Bestimmung intrathrombozytärer Enzymaktivitäten werden verschiedene Methoden herangezogen, die meist isolierte und gewaschene Thrombozyten als Ausgangsmaterial benutzen. Alle Untersuchungen müssen jedoch eine Reihe von Besonderheiten der Thrombozyten berücksichtigen, die eng mit der Plättchenfunktion gekoppelt sind. Zu den dadurch gegebenen Voraussetzungen zählen:

1. Ungerinnbarkeit des zur Messung entnommenen Blutes.
2. Verhinderung der Thrombozytenaggregation und -vulneration, da hierbei unkontrolliert Enzyme freigesetzt werden.
3. Trennung der Thrombozyten von den übrigen zellulären Bestandteilen des Blutes.
4. Zählung der zur Zytolyse zu gelangenden Plättchen als Enzymaktivitätsbezugswert.
5. Verwendung spezieller Pufferlösungen zur Erhaltung der Thrombozytenfunktion.
6. Kontrollierte Zytolyse der von Erythrozyten und Leukozyten getrennten Thrombozyten zur Freisetzung der intrathrombozytären Enzyme und zu deren Messung.
7. Methodische oder rechnerische Aufteilung derjenigen Enzymaktivitäten, welche aus den Thrombozyten stammen und denen, die aus dem Suspensionsmedium stammen.
8. Baldige Messung nach Blutentnahme wegen des Enzymaktivitätsverlustes durch die *in vitro* auftretende Alterung der Thrombozyten.

Im Folgenden sollen kurz zu den genannten Punkten die üblichen Methoden aufgezeigt werden.

Zu 1., 2. und 5.

Als Antikoagulans dienten sowohl Lösungen des Dinatriumsalzes der Äthylendi-aminotetraessigsäure (Na-EDTA; Titriplex III-Bayer bzw. Sequestren-Alrose) (23, 25), als auch Lösungen aus Periston (Fa. Bayer), 0,9 %iger NaCl und Na-EDTA (7) oder einfaches 10 %iges Zitratblut (15). Während GOEBBEL (7) und WALLER (25) einen Humanalbumin-Kochsalz-Phosphat-Puffer oder eine Bikarbonat-Ringer-Glukose-Lösung als Suspensionsmedium benutzten, suspendierten SCHULZ u. HIEPLER (23) die Thrombozyten in dem auf pH 7,2 eingestellten Antikoagulans. OHLER (15) pufferte mit einem auf pH 7,5 eingestellten TRA-Puffer (Triäthanolamin-Hydrochlorid + Na-EDTA im Verhältnis 4,65 : 1).

Zu 3.

Am häufigsten wurden bisher Enzymuntersuchungen an gewaschenen Thrombozyten durchgeführt, die unter Verwendung silikonisierter Laborgeräte durch Differentialzentrifugation gewonnen worden waren (WALLER et al. (25), LÖHR et al. (12), BEESE et al. (1), FONIO (6), KOCHOLATY (9), GOEBBEL et al. (7)). Dabei erhält man die geringsten Verunreinigungen der Thrombozytensuspension mit endogenen Substraten oder mit aus anderen Quellen stammenden Enzymaktivitäten. Allerdings haben die mechanischen Belastungen, denen die Thrombozyten bei diesen Reinigungsverfahren ausgesetzt sind, nachteilige Folgen auf die Funktionstüchtigkeit der Plättchen. So zeigten WALLER u.a. (25) bereits in ihrer ersten Arbeit über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher Thrombozyten, daß wiederholte Zentrifugation und Resuspension der Plättchen Verluste an Enzymaktivitäten zur Folge haben können. OHLER (15) bestätigte diesen Befund mit modifizierter Technik. Ferner sind zur Gewinnung gewaschener Thrombozyten größere Blutmengen nötig.

SALVIDIO (21) und STEFANINI (24) trennten die Plättchen von den anderen geformten Blutbestandteilen mittels Ionenaustauscher-Harz.

BREDDIN et al. (2) erreichten die besten Ergebnisse zur Erhaltung der Vitalität der Thrombozyten, indem sie sie in ihrem angestammten Plasmamilieu beließen. OHLER (15) umging das Auswaschen der Thrombozyten, indem er nach mehrmaligem niedertourigen Abzentrifugieren der Erythrozyten und Leukozyten aus Zitratblut ein thrombozytenreiches Plasma herstellte und so die Plättchen in ihrem physiologischen Suspensionsmedium beließ.

Zu 4.

Die Zählung der zur Thrombozytolyse zu gelangenden Thrombozyten erfolgt üblicherweise nach der direkten Zählmethode von FEISLY u. LÜDIN (5).

Zu 6.

WALLER u. a. (25) und OHLER (15) bereiteten die Thrombozytensuspension zur Enzymbestimmung durch Zytolyse mittels gesättigter Digitoninlösung auf. BEESE u. a. (1) zytolisierten mit 1 %iger Saponinlösung. In beiden Fällen wurden die Ansätze zur Zytolyse 1 Stunde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurden die Zellstromata und ungelöste Digitoninreste 10 Minuten lang bei 3-4000 U/min abzentrifugiert. SALVIDIO (21) führte die Thrombozytenzerstörung zur Enzymfreisetzung mit einem Mikrohomogenisator vom Typ Potter-Elvehjem durch.

GOEBBEL u. a. (7) zytolisierten durch Ultrabeschallung 4 x 30 sec. mit dem Ultraturaxgerät (Fa. Jahnke u. Kunkel) mit anschließender Sedimentierung der Stromateile bei 12000 x g in der Sorvall Kühltzentrifuge. Auch FONIO (6) und KOCHOLATY (9) homogenisierten die Thrombozyten durch Ultrabeschallung. Nach 5 Minuten Beschallung mit einem Raytheon 10 KC erzielte KOCHOLATY eine Zerstörung der Thrombozyten zu 95 %.

Zu 7.

Während bei Waschungen isolierter Thrombozyten aus dem Plasma stammende Fremdaktivitäten eliminiert werden - geringe verbleibende Plasmareste weisen im Vergleich zur Gesamtaktivität zu vernachlässigende Mengen an Enzymaktivi-

täten auf (7, 25) - beläßt OHLER (15) die Thrombozyten bewußt in ihrem physiologischen Plasmamilieu und eliminiert Fremdaktivitäten rechnerisch nach Messung der Gesamtaktivitäten in thrombozytenreichem Plasma und Subtraktion der in zellfreiem Plasma gemessenen Aktivitäten (Plasmasubtraktionsverfahren).

3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten unter Berücksichtigung der erörterten Besonderheiten eingehende Untersuchungen über die Technik des Plasmasubtraktionsverfahrens vorgenommen werden. Ziel der Befunderhebungen war, auch durch andere Zytolyseverfahren zu einer genauen Erfassung der intrathrombozytären Enzymaktivitäten des Kohlenhydratstoffwechsels zu gelangen. Es sollte ein modifiziertes Plasmasubtraktionsverfahren entwickelt werden, das es ermöglichen würde, durch geringere Manipulationen bei Zeitersparnis zu vergleichbaren Meßergebnissen wie bei dem Plasmasubtraktionsverfahren zu gelangen.

II. Methodisches Vorgehen

1. Enzymmessungen

Es wurde das Plasmasubtraktionsverfahren nach OHLER (s. Abb. 1) in drei Versuchsreihen modifiziert angewendet.

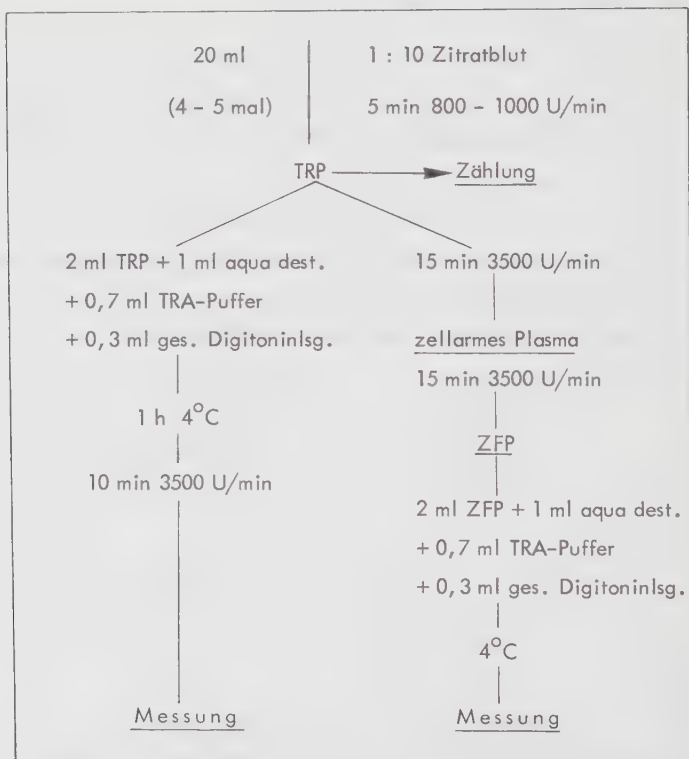


Abb. 1 : Schematische Darstellung des Plasmasubtraktionsverfahrens. Die Differenz der beiden Meßwerte ergibt die intrathrombozytär vorliegenden Enzymaktivitäten.

Als Blutspender dienten gesunde junge Männer und Frauen im Alter von 18 bis 25 Jahren, meist Medizinstudenten, an denen jeweils eine Blutentnahme vorgenommen wurde. An einem Tag wurde nur ein Proband untersucht.

Die optischen Tests für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die Pyruvatkinase, die 3-Phosphoglycerat-1-Kinase und die Laktatdehydrogenase wurden in der von OHLER (15) angegebenen Weise bei 366 nm im Eppendorf-Photometer durchgeführt.

In einer ersten Reihe wurde in 11 Versuchen jeweils von 20 ml 1 : 10 Zitratblut in der von OHLER beschriebenen Art ein TRP hergestellt. Danach Aufteilung in zwei Teile, A und B.

A : Hochtouriges (3500 U/min) Abzentrifugieren der suspendierten Thrombozyten über zweimal 15 Minuten mit anschließendem Abhebern des zellfreien Überstandes : ZFP. Verdünnung 1 : 1 nach OHLER als Testansatz zur Messung.

B : Zählung der im TRP suspendierten Thrombozyten. Verdünnung 1 : 1 des TRP mit 50 % aqua dest. und 50 % TRA-Puffer. Erneute Zählung der Thrombozyten.

Beide Plasmen gelangten anschließend zur vergleichenden Messung im optischen Test (s. Abb. 2).

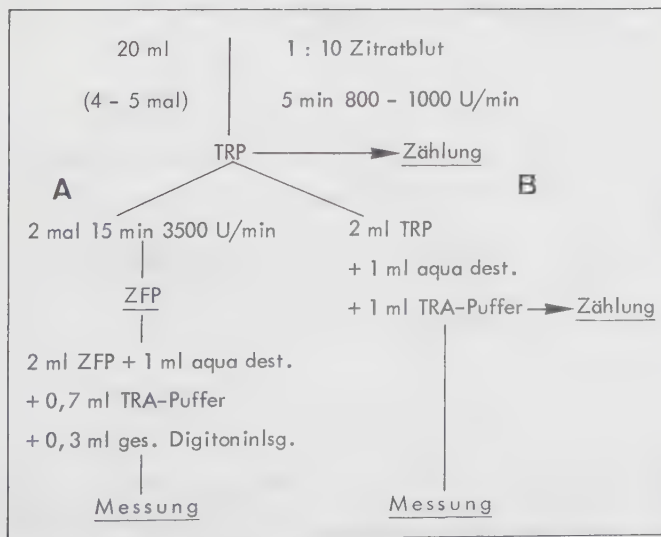


Abb. 2: Vergleichende Messungen eines ZFP (A) und einer Thrombozytensuspension (B). Zählung der Thrombozyten im TRP und im 1 : 1 verdünnten TRP.

In einer zweiten Versuchsreihe sollten die Aktivitäten in 18 verschiedenen TRP verglichen werden, welche A wie üblich nach OHLER zur Thrombozytolyse mit gesättigter Digitoninlösung aufgearbeitet worden waren und B mit 4 %iger Lösung von Triton X-100 (Octylphenoldecaäthylenglycoläther; Packard-instruments, Frankfurt/M.) zur Thrombozytolyse versetzt worden waren.

Arbeitsgang: Herstellung eines TRP; 2 Teile, A und B.

A : Inkubation zur Zytolyse nach OHLER, 1 Stunde bei 4°C im Kühlschrank, anschließend 10 minütiges Abzentrifugieren von Stromateilen und ungelösten Digitoninresten, danach Messung.

B : Statt gesättigter Digitoninlösung wurde eine gleiche Menge 4 %iger Triton X-100-Lösung zur Thrombozytolyse genommen, 10 minütige Inkubation im Eisbad, danach Messung (s. Abb. 3).

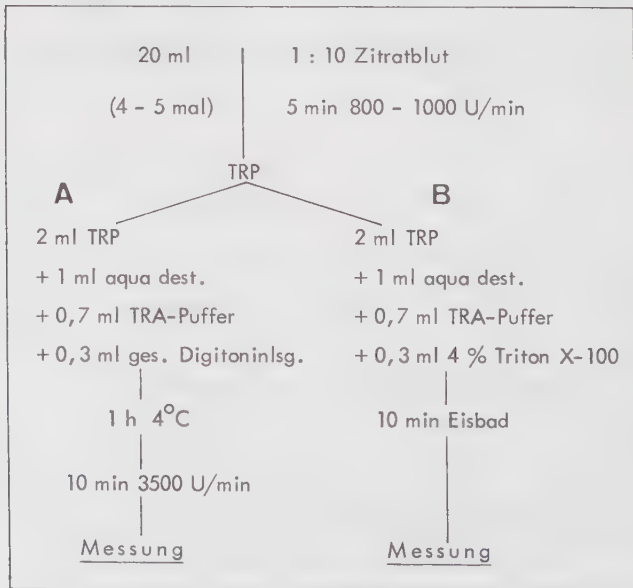


Abb. 3 : Vergleichende Enzymaktivitätsmessungen in TRP, welches mit gesättigter Digitoninlösung (A) bzw. mit 4 %iger Triton X-100-Lösung (B) zur Thrombozytolyse versetzt worden war.

In einer dritten Versuchsreihe wurden die beiden unter B beschriebenen Verfahren kombiniert und mit dem Plasmasubtraktionsverfahren direkt verglichen.
(Schematische Darstellung des Arbeitsganges siehe Abb. 4)

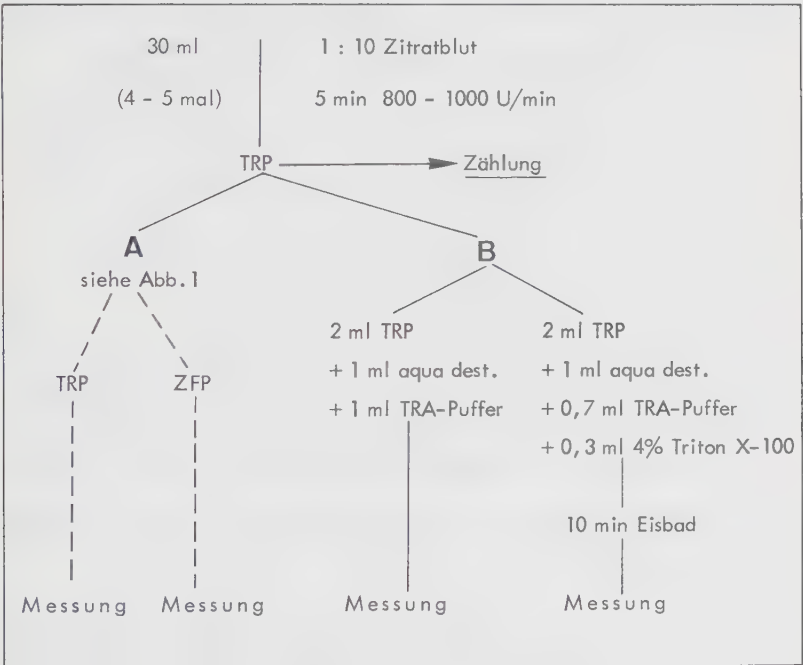


Abb. 4 : Schematische Darstellung der vergleichenden Enzymaktivitätsbestimmungen nach dem Plasmasubtraktionsverfahren (A) und einem modifizierten Plasmasubtraktionsverfahren (B). Teil A entspricht der Abb. 1.

2. Statistische Auswertungsverfahren

- a) Um das neuere Verfahren mit dem bisherigen Vorgehen bei der Enzymaktivitätsmessung mittels des Plasmasubtraktionsverfahrens zu vergleichen, wurden folgende Methoden angewandt:
1. Um systematische Unterschiede zwischen den Verfahren zu ermitteln, wurde der t-Test für verbundene Stichproben (KOLLER (10)) angewandt.
 2. Im Sinne der Zuverlässigkeitsprüfung durch Retest (LIENERT (11)) wurde der Koeffizient r der Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson-Bravais zwischen jeweils korrespondierenden Meßverfahren berechnet und auf Signifikanz gegen 0 getestet (KOLLER), wobei die Regressionsgleichung zur Schätzung der Werte der neu entwickelten Meßverfahren aus den Werten der bisherigen Methode berechnet wurde.
 3. Um das Plasmasubtraktionsverfahren, das 1967 von OHLER (18) an einem Kollektiv erprobt worden war, mit den mit Hilfe der gleichen Methode gewonnenen Ergebnissen der eigenen Versuchspersonen zu vergleichen, wurde der t-Test für unverbundene Stichproben (KOLLER (10)) verwendet.
- b) Die Differenz zweier Korrelationskoeffizienten wurde mit dem $\hat{Z}$ -Test (KOLLER) auf Signifikanz geprüft.

Ein statistischer Test wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn die Prüfgröße den bei $p = 0,05$ resp. $0,01$ und der betreffenden Zahl von Freiheitsgraden tabellierten Wert erreichte oder überschritt.

III. Ergebnisse

In der ersten Meßreihe, beim Vergleich zwischen Enzymaktivitäten in ZFP und in 1 : 1 verdünntem TRP, wurden Absolutwerte in I.E. gemessen. Die beiden Zählungen der Thrombozyten in unverdünntem und verdünntem TRP ergaben, daß keine Thrombozytolyse stattgefunden haben konnte: das verdünnte TRP wies die Hälfte der Anzahl Thrombozyten pro mm³ auf wie das unverdünnte TRP.

Mit Hilfe des t-Tests für verbundene Stichproben wurde auf Signifikanz der Unterschiede zwischen der Reihe des ZFP und der des verdünnten TRP geprüft.

Probe	LDH		PK		PGK		GAPDH	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	121	117	45,0	42,7	77,4	80,4	17,4	14,3
2	135	173	22,9	25,4	106,0	90,2	18,8	12,7
3	115	130	46,7	45,7	86,5	75,6	31,6	21,1
4	120	102	37,7	34,2	77,5	91,4	39,2	34,4
5	182	155	42,0	40,7	82,5	70,4	33,3	27,0
6	141	150	35,3	37,3	105,0	75,5	38,7	36,5
7	129	122	34,2	32,9	101,0	89,0	43,5	33,0
8	125	161	33,3	34,3	92,7	59,4	12,7	6,3
9	109	101	34,8	32,6	63,3	60,3	10,5	7,5
10	89	90	32,4	30,6	79,2	62,4	30,0	28,8
11	131	142	47,8	44,4	61,3	82,7	17,0	16,7

Tab.1 : Vergleich der Enzymaktivitäten in I.E. in ZFP (A) und in 1 : 1 verdünntem, nicht zytolisiertem TRP (B).

Folgende t-Werte ergaben sich ($n = 11$) :

LDH : $t = 0,68$ - n.s.

PK : $t = 1,68$ - n.s.

PGK : $t = 1,73$ - n.s.

GAPDH : $t = 4,79$ - $p < 1\%$

Die Plasmaaktivitäten der LDH, PK und PGK unterschieden sich nicht signifikant nach den beiden Methoden, während die Plasma-GAPDH-Werte im nicht zytolysierten TRP signifikant tiefer lagen.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten r zwischen den Werten der ZFP- und der TRP-Reihe ergab folgende Werte ($n = 11$) :

LDH : $r = 0,683$ - $p < 5\%$

PK : $r = 0,968$ - $p < 1\%$

PGK : $r = 0,270$ - n.s.

GAPDH : $r = 0,956$ - $p < 1\%$

Lediglich für die PGK konnte keine eindeutige Korrelation zwischen den beiden Reihen festgestellt werden (siehe Abb.5).

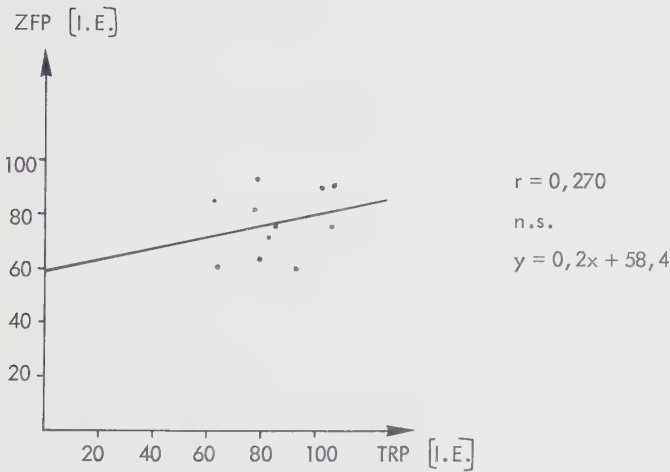
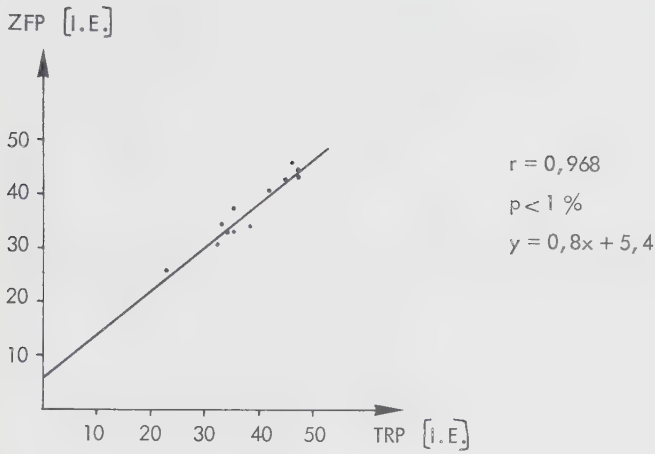


Abb. 5 : Graphische Darstellung der Korrelation zwischen Aktivitäten in ZFP und verdünntem TRP. Oben: PK, unten:PGK.

In der zweiten Meßreihe, beim Vergleich der Enzymaktivitäten im TRP, welches A mit Digitonin und B mit 4 %iger Lösung von Triton X-100 zytolysiert worden war, wurden, als Ausdruck der Enzymaktivitäten, die pro Extinktionsänderung von 0,05 gemessenen Zeiten (in sec) direkt miteinander verglichen. Auf die gesonderte Messung der rein plasmatischen Aktivitäten wurde verzichtet, da diese in beiden Ansätzen gleich hoch waren. Die gemessenen Zeiten waren also ein Maß für die Gesamtaktivitäten intrathrombozytärer und plasmatischer Enzyme.

Probe	LDH		PK		PGK		GAPDH	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	20	19	65	62	98	96	140	139
2	13	14	35	37	55	59	67	71
3	22	21	58	56	81	72	94	105
4	23	25	87	97	86	69	142	165
5	15	10	39	40	60	56	91	90
6	15	15	50	50	62	65	106	98
7	32	33	80	83	97	105	126	139
8	25	25	66	75	93	91	119	132
9	27	28	75	75	80	82	113	123
10	26	26	53	56	91	88	132	142
11	29	29	60	60	37	33	151	152
12	13	25	42	48	37	39	78	90
13	26	28	70	67	55	55	137	136
14	27	28	70	73	59	56	128	131
15	39	30	70	73	52	65	70	81
16	30	26	60	59	54	66	149	149
17	42	41	130	118	73	91	302	335
18	48	30	87	87	76	68	228	225

Tab. 2 : Vergleich der Enzymaktivitäten in TRP, welches mit Digitonin (A) und mit 4 %iger Triton X-100-Lösung (B) zytolysiert worden war. Werte in sec.

Der t-Test für verbundene Stichproben ergab für $n = 18$ folgende Werte:

LDH : $t = 0,76 - n.s.$

PK : $t = 0,92 - n.s.$

PGK : $t = 0,57 - n.s.$

GAPDH : $t = 3,06 - p < 1 \%$

Während sich bei der LDH, PK und PGK nach der Methode B keine signifikanten Abweichungen fanden, lag die Gesamtaktivität der GAPDH signifikant höher als nach A.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten r zwischen den mit Digitonin und Triton X-100 zytolysierten Proben ergab ($n = 18$) :

LDH : $r = 0,800 - p < 1 \%$

PK : $r = 0,976 - p < 1 \%$

PGK : $r = 0,912 - p < 1 \%$

GAPDH : $r = 0,988 - p < 1 \%$

Beide Reihen sind, mit einer Signifikanz von 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit, eng korreliert.

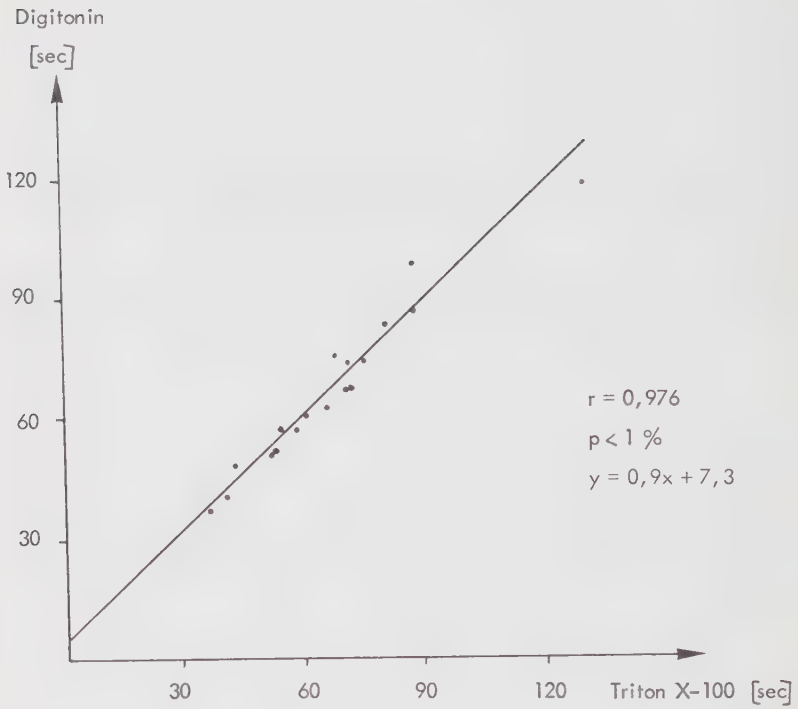


Abb. 6 : Graphische Darstellung der Korrelation zwischen Aktivitäten der PK in TRP, welches mit Digitonin und mit Triton X-100 zytolisiert wurde.

In der dritten Meßreihe, dem direkten Vergleich des Plasmasubtraktionsverfahrens (A) mit dem modifizierten Plasmasubtraktionsverfahren (B) wurden die Absolutwerte der Aktivitäten intrathrombozytärer Enzyme in I.E. / 10^{11} Thrombozyten gemessen.

Probe	LDH		PK		PGK		GAPDH	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	198	211	151	165	147	154	104	92
2	208	198	140	147	138	147	81	69
3	173	189	127	120	110	122	88	76
4	200	206	143	157	185	246	118	82
5	188	194	160	176	153	110	80	74
6	112	110	91	88	94	97	48	47
7	151	175	126	144	189	258	69	76
8	184	150	164	173	133	139	101	107
9	176	183	152	150	142	154	124	121
10	132	137	108	106	92	120	79	73

Tab. 3 : Vergleich zwischen PSV nach OHLER (A) und eigenem modifiziertem PSV (B) $n = 10$. Aktivitäten in I.E. / 10^{11} Thrombozyten. (25°C, pH 7,5 TRA-Puffer)

Der t-Test für verbundene Stichproben ergab folgende t-Werte ($n = 10$) :

LDH : $t = 0,612$ - n.s.

PK : $t = 2,205$ - n.s.

PGK : $t = 1,650$ - n.s.

GAPDH : $t = 1,949$ - n.s.

Erwartungsgemäß unterschieden sich die Aktivitäten der LDH, PK und PGK nicht signifikant voneinander. Während für die GAPDH nach dem modifizierten Verfahren etwas höhere Enzymaktivitäten zu erwarten gewesen wären, lagen sie im Durchschnitt etwas tiefer als nach dem Plasmasubtraktionsverfahren, jedoch ohne daß der Unterschied statistisch signifikant war.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten r zwischen den durch das Plasma-subtraktionsverfahren und den durch das modifizierte Verfahren gemessenen intra-thrombozytären Enzymaktivitäten ergab ($n = 10$) :

LDH : $r = 0,876 - p < 1 \%$

PK : $r = 0,963 - p < 1 \%$

PGK : $r = 0,854 - p < 1 \%$

GAPDH : $r = 0,850 - p < 1 \%$

Auch hier konnte zwischen dem Plasmasubtraktionsverfahren und dem modifizierten Plasmasubtraktionsverfahren eine signifikante Korrelation festgestellt werden.

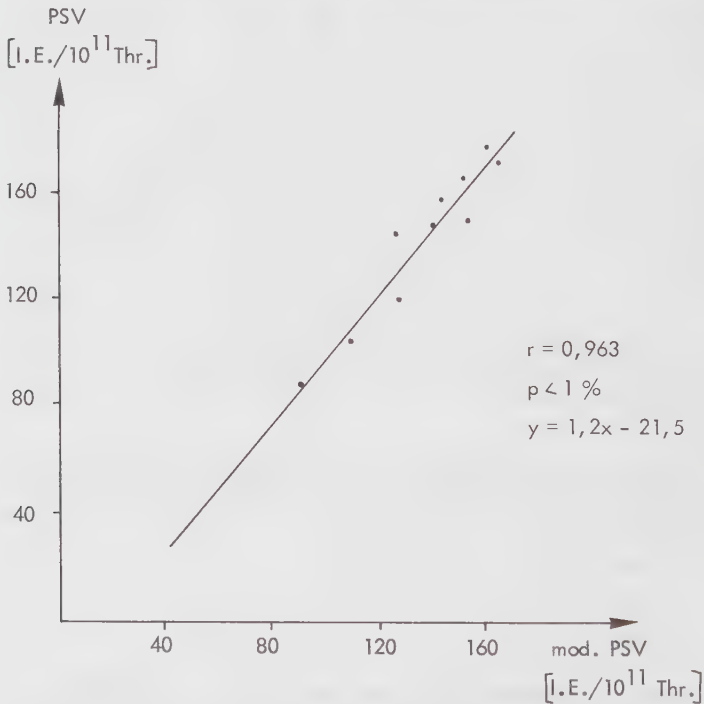


Abb. 7 : Graphische Darstellung der Korrelation zwischen intrathrombozytären Enzymaktivitäten der PK, welche nach dem PSV nach OHLER und nach eigenem modifiziertem PSV gemessen wurden.

Prüft man mit Hilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben die nach demselben Meßverfahren (PSV nach OHLER) gewonnenen Werte intrathrombozytärer Enzyme von OHLER ((15) 1967) und eigene auf signifikante Unterschiede der Meßreihen, so ergibt sich für die :

PGK : $t = 0,50 - n.s.$

LDH : $t = 0,12 - n.s.$

PK : $t = 3,87 - p < 1 \%$

GAPDH : $t = 6,25 - p < 1 \%$

Die eigenen Messungen unterschieden sich also nur im Falle der LDH und PGK nicht signifikant von den von OHLER gefundenen Werten, während die PK- und GAPDH-Werte signifikant tiefer lagen (siehe Tab. 5).

Da sich unsere Fallzahl von der OHLERs unterschied, wurden die Standardabweichungen des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) verglichen, welche bei uns in allen vier Fällen größer waren (siehe Tab. 4).

	$s_{\bar{x}}$ (O.) n=15	$s_{\bar{x}}$ (K.) n=10
PGK	5,05	10,53
LDH	4,92	9,89
PK	3,56	7,37
GAPDH	5,70	7,27

Tab. 4 : Standardabweichungen des Mittelwertes intrathrombozytärer Enzymaktivitäten, gemessen nach dem PSV von OHLER (O.) und nach eigenen Messungen (K.).

	a			b			c			d			e		
	$\bar{X}$	s	n	$\bar{X}$	s	n	$\bar{X}$	s	n	$\bar{X}$	s	n	$\bar{X}$	s	n
PGK	92,0	+ 10,1	15	32,4	+ 2,0	14	133,0	+ 19,5	15	138,3	+ 33,3	10	154,7	+ 54,7	10
LDH	97,1	+ 18,6	15	217,0	+ 30,0	14	173,5	+ 19,0	15	172,2	+ 31,3	10	175,3	+ 32,9	10
PK	59,6	+ 17,5	15	23,6	+ 3,5	14	165,0	+ 14,0	15	136,2	+ 23,3	10	142,6	+ 29,2	10
GAPDH	78,1	+ 12,2	15	39,4	+ 3,0	14	143,5	+ 20,1	15	89,2	+ 23,0	10	81,7	+ 20,7	10

Tab. 5 : Mittelwerte ($\bar{X}$) und einfache Standardabweichungen (s) intrathrombozytärer Enzymaktivitäten nach : a) WALLER u. GROSS*, b) GOEBBEL et al. (7), c) OHLER (18), d) eigenen Messungen mit Hilfe des PSV und e) eigenen Messungen mit Hilfe des modifizierten PSV. (I.E./10¹¹ Thr.)

* zitiert in (18)

IV. Diskussion der Ergebnisse

Die Bestimmung intrathrombozytärer Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels ist von klinischer Bedeutung bei der Diagnose der thrombozytären Enzymopathien (15).

Die Schwierigkeiten bei der Bestimmung der intrathrombozytären Enzymaktivitäten ergeben sich aus der leichten Vulnerabilität der Thrombozyten und ihrer besonderen Anfälligkeit gegenüber mechanischen Manipulationen. Das Plasmasubtraktionsverfahren nach OHLER stellt in dieser Hinsicht eine weitgehende Vereinfachung der bis dahin üblichen Methoden dar und berücksichtigt die physiologischen Besonderheiten der Thrombozyten.

OHLER (15) beschrieb den Einfluß des Zentrifugationsvorganges auf die Aktivitätsmessungen intrathrombozytärer Enzyme. Beim hochtourigen Zentrifugieren von thrombozytenreichem Plasma zur Herstellung zellfreien Plasmas können möglicherweise Thrombozyten zerstört und Enzyme freigesetzt werden, ein Befund, den EHMAN (4) nachvollziehen konnte. Dies kann sich bei der Errechnung der intrathrombozytären Enzymaktivitäten infolge zu hoher Plasmawerte in zu niedrigen Endergebnissen niederschlagen. WALLER u.a. (25) beschrieben einen ähnlichen Aktivitätsverlust nach mehrmaligen Thrombozytenwaschungen.

Die Zählung der Thrombozyten im 1 : 1, mit 50 % aqua dest. und 50 % TRA-Puffer, verdünnten TRP ergab, daß bei dieser Verdünnung mit hypotonischer Lösung noch kein Schwund an Thrombozyten stattfindet, eine osmotische Thrombozytolyse, mit konsekutiver Freisetzung intrathrombozytär gelegener Enzyme, also nicht stattfindet.

EHMAN (4) stellte fest, daß die Aktivitäten der GAPDH, LDH, PGK und PK, gemessen in nicht zytolysiertem verdünntem TRP, tiefer lagen als in ZFP, welches durch hochtouriges Abzentrifugieren der Thrombozyten aus TRP gewonnen worden war. In der ersten Versuchsreihe konnten wir diesen Befund insofern bestätigen, als die GAPDH-Werte im nichtzytolysierten verdünnten TRP signifikant unter den im ZFP gemessenen Werten lagen, während die Aktivitäten der drei anderen untersuchten Enzyme sich nach den beiden Methoden nicht signifikant unterschieden. Somit kann auf die Herstellung eines zellfreien Plasmas verzichtet werden, was

einerseits eine mögliche Vulneration der Plättchen durch Zentrifugation verhindert, andererseits einen Arbeitsgang erspart.

Im Falle der PGK war eine eindeutige Korrelation zwischen den beiden Methoden nicht nachzuweisen. Aus dem entsprechenden Korrelationsdiagramm (Abb. 5) ist zu ersehen, daß nicht einzelne Ausreißer die niedrige Korrelation verursacht haben. Prüft man die entsprechenden Korrelationskoeffizienten für PGK und LDH (welche auch nur 5 % Signifikanz zeigte) auf Signifikanz der Differenz (KOLLER), so ergibt sich mit einer Prüfgröße $\hat{Z}$ von 1,116 kein signifikanter Unterschied, so daß dieser extrem niedrige Korrelationskoeffizient als zufallsbedingt angesehen werden kann.

SCHRÖCKERT und BÄSSLER (22) erzielten bei Messungen der Gesamtaktivitäten von GOT in Leberhomogenaten die größte Enzymausbeute nach Zytolyse mit einer 4 %igen wässrigen Lösung von Triton X-100. Diese Methode der Zytolyse war selbst gegenüber einer Ultrabeschallung weit ergiebiger.

In der zweiten Versuchsreihe konnten wir zeigen, daß sich die Aktivitäten der LDH, PGK und PK in TRP, welches wie bisher während einer Stunde mit gesättigter Digitoninlösung zytolysiert worden war, von denen eines TRP, welches 10 Minuten im Eisbad mit 4 %iger wässriger Lösung von Triton X-100 zytolysiert worden war, nicht signifikant unterschieden. Die GAPDH-Werte lagen signifikant höher nach Zytolyse mit Digitonin. Nach den Erfahrungen von SCHRÖCKERT und BÄSSLER (22) wäre vielleicht zu erwarten gewesen, daß Triton X-100 eine noch bessere Ausbeute an intrathrombozytären Enzymen liefert, was sich aber nur bei der GAPDH bestätigt fand.

Die unbeeinflussten Reaktionsabläufe nach Zytolyse mit Triton X-100, die etwas höhere Ausbeute an GAPDH und die nicht signifikanten Unterschiede beider Methoden der Zytolyse bei der LDH, PGK und PK, sowie die in allen vier Fällen signifikante Korrelation lassen es zu, die einstündige Thrombozytolyse mit gesättigter Digitoninlösung durch eine solche mit 4 %iger wässriger Lösung von Triton X-100 bei 10 Minuten Inkubation im Eisbad zu ersetzen. Die Zeitersparnis beträgt hier eine Stunde, da auch auf das anschließende 10minütige Abzentrifugieren ungeklärter Teile verzichtet werden kann.

Die Kombination der beiden Methoden, als modifiziertes Plasmasubtraktionsverfahren, ließ im direkten Vergleich mit dem von OHLER inaugurierten Plasmasubtraktionsverfahren erwarten, daß sich die intrathrombozytären Enzymaktivitäten der LDH, PGK und PK nicht signifikant unterscheiden würden. Tatsächlich war dies der Fall. Bei der GAPDH hätte man aufgrund der Vorergebnisse erwartet, daß die durchschnittliche Aktivität nach dem modifizierten PSV höher liegen würde, bedingt durch a) die geringeren Plasmaaktivitäten und b) die höheren Aktivitäten im mit Triton X-100 zytolysierten TRP. Tatsächlich jedoch lagen die Aktivitäten im Durchschnitt etwas tiefer, ohne sich aber vom Plasmasubtraktionsverfahren signifikant zu unterscheiden. Wir sehen dies laborbedingt an. In allen vier Fällen bestand wiederum eine signifikante Korrelation.

Der Vergleich zwischen unseren Ergebnissen nach dem PSV und denen von OHLER 1967 nach demselben Meßverfahren zeigt nur im Falle der LDH und PGK keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte. Auch waren unsere mittleren Standardabweichungen in jedem Falle größer, was mit einer geringeren Fallzahl ($n = 10$ gegenüber $n = 15$ bei OHLER) und einem Ausreißer nach unten in allen vier Fällen zu deuten ist.

Abschließend kann also gesagt werden, daß das Plasmasubtraktionsverfahren in der besprochenen Modifikation zur Messung intrathrombozytärer Enzymaktivitäten der GAPDH, LDH, PGK und PK angewendet werden kann. Als vorteilhaft erachten wir hierbei die Vereinfachung durch Einsparung eines Arbeitsganges und Zeitersparnis von einer Stunde.

V. Zusammenfassung

1. Die Bedeutung und die üblichen Verfahren zur Messung intrathrombozytärer Enzyme werden kurz aufgezeigt.
2. In der vorgelegten Arbeit wird eine Methode entwickelt, intrathrombozytäre Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels zu messen, die von dem von OHLER inaugurierten Plasmasubtraktionsverfahren ausgeht.
3. Auf die Herstellung eines zellfreien Plasmas kann verzichtet werden. Es werden die reinen Plasmaaktivitäten im nichtzytolierten thrombozytenreichen Plasma bestimmt.
4. Die Thrombozytolyse eines thrombozytenreichen Plasmas wird mit 4 %iger wässriger Lösung von Triton X-100 durchgeführt, was gegenüber Digitoninlösung eine Zeitersparnis von einer Stunde mit sich bringt.
5. Die Kombination der unter 3. und 4. angegebenen Methoden stellt sich, als modifiziertes Plasmasubtraktionsverfahren, im direkten Vergleich mit dem Plasmasubtraktionsverfahren als gleichwertig heraus.

VI. Literaturverzeichnis

1. BEESE, J., W.FASS, E.GRÜNER und R.HASCHEN :
Proteolytische Enzyme in normalen menschlichen Blutplättchen.
Klin. Wschr. 44 , 1049 (1966)
2. BREDDIN, K., W.FRITZSCHE und W.SPIELMANN :
Zur Frage der Thrombozytenkonservierung.
Klin. Wschr. 42 , 180 (1964)
3. BÜCHER, T., W.LUH und D.PETTE :
Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnukleotiden.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder : Handbuch der physiologisch- und patho-
logisch-chemischen Analyse, Bd. VI A, S. 292 ff.
Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964
4. EHMAN, W. :
Enzymaktivitätsbestimmungen in Thrombozyten, im Plasma und im Serum
bei hyper- und arregeneratorischen Thrombozytopenien.
Med. Diss. Mainz , 1973
5. FEISSLY, R. und H.LÜDIN :
Zit. in : J.Jürgens u. F.K. Beller : Klinische Methoden der Blutgerin-
nungsanalyse S. 127
Stuttgart, 1959
6. FONIO, A. :
Über das funktionelle Verhalten der isolierten Strukturelemente der
Thrombozyten.
Acta haematol. (Basel) 6 , 207 (1951)
7. GOEBBEL, H., H.BICKEL, Ch.BODE, R.EGBRING und G.A.MARTINI :
Veränderte Aktivitäten der Enzyme des Energiestoffwechsels in Thrombozyten
von Patienten mit Leberzirrhose und Splenomegalie.
Klin. Wschr. 46 , 526 (1968)
8. GROSS, R., G.W.LÖHR and H.D.WALLER :
Long term preservation of functionally intact platelets.
Proc. VII th Congress Europ. Soc. Haematol., part II, 686 (1960)
9. KOCHOLATY, W. :
Peptidase activity in human platelets.
Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttgart) 7 , 295 (1962)

10. KOLLER, S. :
Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. 4. Aufl.
Darmstadt 1969
11. LIENERT, G.A. :
Testaufbau und Testanalyse
Weinheim/Bergstraße 1961
12. LÖHR, G.W., H.D.WALLER und R.GROSS :
Beziehung zwischen Plättchenstoffwechsel und Retraktion des Blutgerinnsels
unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozytopathie Glanzmann-
Naegeli.
Dtsch. med. Wschr. 86 , 879, 946 (1961)
13. LÖHR, G.W., H.D.WALLER und O.KARGES :
Quantitative Fermentbestimmungen in roten Blutzellen.
Klin. Wschr. 35 , 871 (1957)
14. LÖHR, G.W., H.D.WALLER und R.GROSS :
Zellstoffwechsel und Zellalterung.
Klin. Wschr. 37 , 833 (1959)
15. OHLER, W.G.A. :
Die klinische Bedeutung der intrathrombozytären Enzyme des Kohlenhydrat-
stoffwechsels.
Habilitationsschrift, Mainz, 1967
16. OHLER, W.G.A. :
Die Verwendung thrombozytenreichen Plasmas zur Bestimmung intrathrom-
bozytärer Enzyme.
Therapiewoche 18 , 2115 (1968)
17. OHLER, W.G.A. :
Intrathrombozytärer Pyruvatkinase- und Glycerinaldehyd-3-phosphatde-
hydrogenasemangel bei Thrombasthenie.
Therapiewoche 20 , 293 (1970)
18. OHLER, W.G.A. :
Ergebnisse und Bedeutung von Enzymbestimmungen an Thrombozyten.
Klin. Wschr. 46 , 737 (1968)
19. OHLER, W.G.A. :
Problems of the determination of intrathrombocytic enzymes.
V th Congress Asian and Pacific Soc. Haematol., Istanbul 1969
20. RAPOPORT, S. :
Reifungs- und Alterungsvorgänge in Erythrozyten.
Folia Haematol. (Leipzig) 78 , 364 (1962)

21. SALVIDIO, E. :
Biochemical aspects of blood platelets.
Acta haematol. 11 , 301 (1954)
22. SCHRÖCKERT, W.M. und K.H.BÄSSLER :
Messung der Gesamtaktivität von Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
in Leberhomogenaten.
Clin. Chim. Acta 33 , 55 (1971)
23. SCHULZ, H. und E.HIEPLER :
Über die Lokalisierung von gerinnungsphysiologischen Aktivitäten.
Klin. Wschr. 37 , 273 (1959)
24. STEFANINI, M., W.DAMESHEK, J.B.CHATTERJEE, E.ADELSON,
and I.B.MELNICOFF :
Observations on the properties and mechanism of action of potent
platelet agglutinin detected in the serum of a patient with idiopathic
thrombocytopenic purpura.
Blood 8 , 26 (1953)
25. WALLER, H.D., G.W.LÖHR, F.GRIGNANI und R.GROSS :
Über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher Thrombozyten.
Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttgart) 3 , 520 (1959)
26. WALLER, H.D. und R.GROSS :
Genetische Enzymdefekte als Ursache von Thrombozytopathien.
Verh. Kongr. inn. Med. 70 , 476 (1964)
27. WITT, I., H.MÜLLER und W.KÜNZER :
Vergleichende biochemische Untersuchungen an Erythrozyten aus
Neugeborenen- und Erwachsenenblut.
Klin. Wschr. 45 , 262 (1967)

Abkürzungen

GAPDH : Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GOT : Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

I.E. : Internationale Einheit

LDH : Laktatdehydrogenase

n.s. : nicht signifikant

PGK : 3-Phosphoglycerat-1-Kinase

PK : Pyruvatkinase

PSV : Plasmasubtraktionsverfahren

TRP : thrombozytenreiches Plasma

ZFP : zellfreies Plasma

Lebenslauf

Als erster von zwei Söhnen des Musikwissenschaftlers Prof. Dr. Günter Kehr und seiner Frau Friedel Kehr, geb. Harth, wurde ich, Stefan Kehr, am 9. November 1949 in Mainz geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Mainz, 1960 trat ich in das Staatliche Gutenberg-Gymnasium Mainz ein und legte hier im Frühjahr 1968 am mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig die Reifeprüfung ab. Zwischendurch, im Jahre 1965, verbrachte ich fünf Monate als Austauschschüler in den USA.

Das Studium der Medizin begann ich am 15. Oktober 1968 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich ein Jahr später das Vorphysikum und im Frühjahr 1971 das Physikum bestand.

Das klinische Studium begann ich, ebenfalls in Mainz, im Sommersemester 1971. Zur Zeit studiere ich im sechsten klinischen Semester und bereite mich auf das Staatsexamen vor, das ich im Frühjahr 1974 ablegen will.

Für die Beratung und Hilfe bei der Bearbeitung der Ergebnisse gilt mein
herzlicher Dank Frau Dr.Dr.P.Netter vom Institut für Medizinische
Statistik und Dokumentation (Direktor : Prof. Dr. S.Koller).

